

Table II. Kininogenase in rat kidney after aortic stenosis

Experimental procedure	Blood pressure (mm Hg)		Kininogenase <sup>a</sup> (L/R %)	
	Concentration	Total		
Control	Mean	111	96	129
	Range	110–112	45–124	50–183
	n	3	3	3
2-week aortic stenosis	Mean	171	310	135
	Range	155–200	180–739	65–282
	n	8	8	8
2-week aortic stenosis + ligation of left ureter	Mean	162	221	99
	Range	105–200	103–792	25–302
	n	5	5	5

<sup>a</sup> As Table I. Kininogenase ratios expressed in concentrations are greater than totals since the left 'stenotic' kidney becomes reduced in size.

Since JELÍNEK and GROSS<sup>13</sup> found that experimental aortic stenosis in rats increased the renin content of the 'stenotic' kidney approximately 25-fold, we measured renal kininogenase in similar experiments. In distinction to the findings of the above authors for renin, however, the total kininogenase content of the 'stenotic' left kidney did not differ significantly from that of the other kidney. When JELÍNEK and GROSS expressed renin concentrations per g kidney tissue, the concentration in the 'stenotic' kidney was approximately 50 times greater than in the other; when our results are similarly expressed, the kininogenase concentration is only 2–3 times greater. Also, whereas these authors noted further increases in renin concentration of up to 300-fold over the normal kidney if ligation of the ureter was added to the aortic stenosis, similar experiments by us failed to show any additional change in kininogenase content. These results are shown in Table II.

Our experiments support the view that, unlike renin, renal kininogenase is located in the tubular system of the

kidney. These enzymes behave very differently in response to various procedures. The role of the renal kininogenase-kinin system in physiology or pathology requires further investigation.

**Zusammenfassung.** Nachweis, dass Abbinden des Harnleiters von Ratten in 1–3 Wochen eine fortschreitende und ausgesprochene Verminderung der Kininogenase in der Niere verursacht. Experimentelle Verengerung der Aorta kinegen hat entweder keine Wirkung auf die Nieren-Kininogenase oder erhöht sie nur geringfügig.

SUSANNE BARTON and M. SCHACHTER<sup>17</sup>

Department of Physiology, University of Alberta, Edmonton 7 (Alberta, Canada), 14 May 1974.

<sup>17</sup> This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and the Alberta Heart Foundation.

## Einfluss von elektrischer Stimulation auf Phosphorylase-Aktivität und cAMP-Gehalt in Insektenflugmuskeln von *Locusta migratoria*

In der Leber und möglicherweise im Fettkörper der Insekten wird die Phosphorylase-Aktivität humoral über cAMP<sup>1</sup> reguliert<sup>2</sup>. In Vertebratenmuskeln ist ebenfalls eine hormonelle Steuerung der Phosphorylase-Aktivität durch cAMP möglich<sup>3</sup>. Wichtiger scheint hier dagegen die raschere Aktivierung der Phosphorylase durch die Erhöhung der Calcium-Konzentration im Sarcoplasma zu sein<sup>4</sup>. Bei dieser nervösen Steuerung der Glykogenolyse ist cAMP nicht eingeschaltet, da bei der Kontraktion von Skelettmuskeln nach elektrischer Stimulation kein Anstieg des cAMP-Gehalts festgestellt wurde, wohl aber eine Aktivierung der Phosphorylase<sup>5</sup>.

Untersuchungen von HANSFORD und SACKTOR<sup>6</sup> zur Regulation der Phosphorylase-Aktivität in Insektenflugmuskeln haben ebenfalls eine Steuerung der Glykogenolyse über die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Sarcoplasma wahrscheinlich gemacht. Bislang wurde nicht untersucht, ob eine Erhöhung der Phosphorylase-Aktivität auch durch cAMP verursacht werden kann.

Um diese Frage zu klären, wurden die Flugmuskeln in Thoraxhalbpräparaten von *Locusta migratoria* durch elektrische Reizung des Bauchmarks<sup>7</sup> zur Kontraktion gebracht und anschliessend die Phosphorylase-Aktivität

und der cAMP-Gehalt bestimmt<sup>8</sup>. Es wurden zwei Reizfrequenzen (2 und 20 Doppelimpulse/sec) angewendet, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Muskelarbeit und Veränderungen der Phosphorylase-Aktivität bzw. des cAMP-Gehalts feststellen zu können. Bei der höheren Reizfrequenz trat innerhalb von 5–10 sec Tetanus ein, nach 30–40 sec begannen die Muskeln zu

<sup>1</sup> Abkürzungen: cAMP; zyklisches 3',5'-Adenosin-Monophosphat; AMP, Adenosin-5'-Monophosphat.

<sup>2</sup> T. W. RALL und E. W. SUTHERLAND, J. biol. Chem. 232, 1065 (1958). – J. E. STEELE, Am. Zool. 4, 328 (1964).

<sup>3</sup> G. J. DRUMMOND, J. P. HARWOOD und C. A. POWELL, J. biol. Chem. 244, 4235 (1969).

<sup>4</sup> L. M. G. HEILMEYER, F. MEYER, R. H. HASCHKE und E. H. FISCHER, J. biol. Chem. 245, 6649 (1970).

<sup>5</sup> J. B. POSNER, R. STERN und E. G. KREBS, J. biol. Chem. 240, 982 (1965).

<sup>6</sup> R. G. HANSFORD und B. SACKTOR, FEBS-Lett. 7, 183 (1970).

<sup>7</sup> D. J. CANDY, J. Insect Physiol. 16, 531 (1970).

<sup>8</sup> Herrn Dr. R. ACHAZI und Herrn Dr. R. WILHELM vom Zoologischen Institut der Universität Münster sei an dieser Stelle für viele hilfreiche Ratschläge zu den Experimenten gedankt.

erschlaffen. Die Extraktion der Phosphorylase erfolgte bei pH 6,5 nach CHILDRESS und SACKTOR<sup>9</sup>. Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde bei 30°C und pH 6,0 in Richtung Glykogensynthese mit und ohne AMP durchgeführt. Die Testansätze waren 2%ig an Glykogen (AMP-frei), 128 mM an Glucose-1-phosphat und gegebenenfalls 8 mM an AMP. Die Phosphatbestimmung erfolgte nach YODA und HOKIN<sup>10</sup>. Kontrollen ohne Glykogen im Ansatz zeigten keine Phosphatfreisetzung.

Zur Bestimmung des cAMP-Gehalts wurden die Thoraxhälften mit flüssigem Stickstoff gefroren, pulverisiert und mit 5%iger Trichloressigsäure extrahiert. Im Extrakt störende Nukleotide wurden mit  $ZnSO_4/Ba(OH)_2$  ausgefällt<sup>11</sup> und cAMP nach Gilman<sup>12</sup> bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY et al.<sup>13</sup>.

Die Ergebnisse der Phosphorylase-Messungen sind in Figur 1 dargestellt. Es zeigt sich bei beiden Reizfrequenzen ein leichter Anstieg der Phosphorylase-Aktivität mit zunehmender Reizdauer. Dabei steigt bei der Reizfrequenz von 20 Doppelimpulsen/sec die Phosphorylase-Aktivität ohne AMP etwas stärker als bei der niedrigeren Reizfrequenz. Bei der hohen Reizfrequenz, bei der – wie erwähnt – die Muskeln nach 5–10 sec in den Tatenus gehen und nach etwa 30 sec zu erschlaffen beginnen, ist ausserdem festzustellen, dass mit dem Nachlassen der Muskelspannung die Phosphorylase-Aktivität sinkt.

Figur 2 zeigt die Messungen des cAMP-Gehalts. Bei der niedrigen Reizfrequenz ist der cAMP-Spiegel nach einer

Reizdauer von 5 sec um den Faktor 2 gestiegen und bleibt bei längerer Reizdauer auf diesem Niveau. Bei der 10fach höheren Reizfrequenz ist ein kontinuierlicher Anstieg des cAMP-Gehalts mit zunehmender Reizdauer festzustellen. Im Vergleich damit ändert sich der cAMP-Spiegel in Vertebraten-Skelettmuskeln nach elektrischer Stimulation nicht<sup>5</sup>.

Es ist demnach festzuhalten, dass bei der elektrischen Reizung der Flugmuskeln von *L. migratoria* sowohl die Phosphorylase-Aktivität als auch die cAMP-Konzentration in den Thoraxhälften steigt. Dabei ist eine Korrelation zwischen dem Anstieg der Phosphorylase-Aktivität und dem des cAMP-Gehalts im Fall der niedrigen Reizfrequenz gegeben. Bei der höheren Reizfrequenz ist eine derartige Korrelation nicht festzustellen, da der cAMP-Spiegel nach einer Reizdauer von 60 sec weiter gestiegen ist, während die Phosphorylase-Aktivität wieder den Ruhewert erreicht hat. Es kann demnach zwar nicht ausgeschlossen werden, dass cAMP regulierend auf die

<sup>9</sup> C. C. CHILDRESS und B. SACKTOR, J. biol. Chem. 245, 2927 (1970).

<sup>10</sup> A. YODA und L. E. HOKIN, Biochem. biophys. Res. Commun. 40, 880 (1970).

<sup>11</sup> G. KRISHNA, B. WEISS und B. B. BRODIE, J. Pharmac. exp. Ther. 163, 379 (1968).

<sup>12</sup> A. G. GILMAN, Proc. natn. Acad. Sci., USA 67, 305 (1970).

<sup>13</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

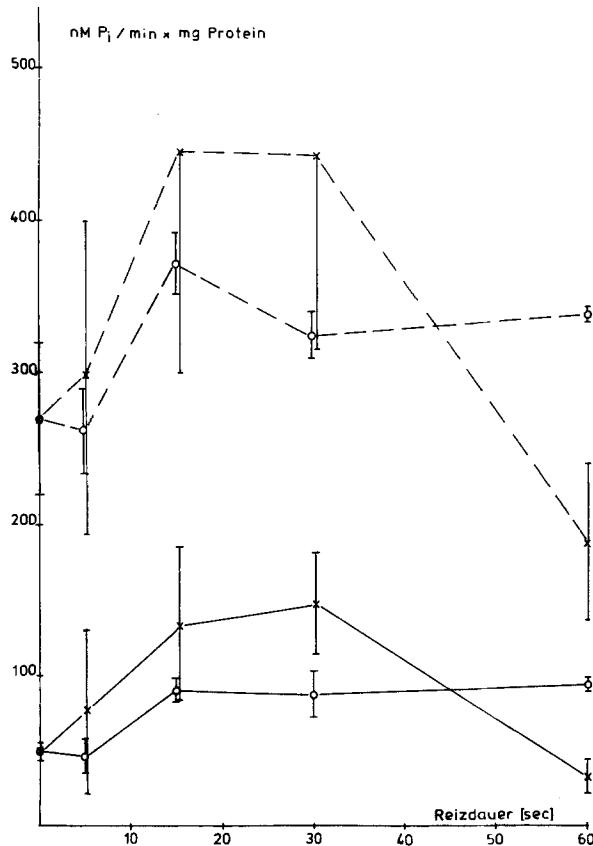


Fig. 1. Phosphorylase-Aktivität in Thoraxhälften nach elektrischer Stimulation (durchgezogene Linie ohne AMP, gestrichelte Linie mit AMP); die vertikalen Linien geben die Standardabweichungen an. ○, Reizfrequenz 2 Doppelimpulse/sec; ×, Reizfrequenz 20 Doppelimpulse/sec.

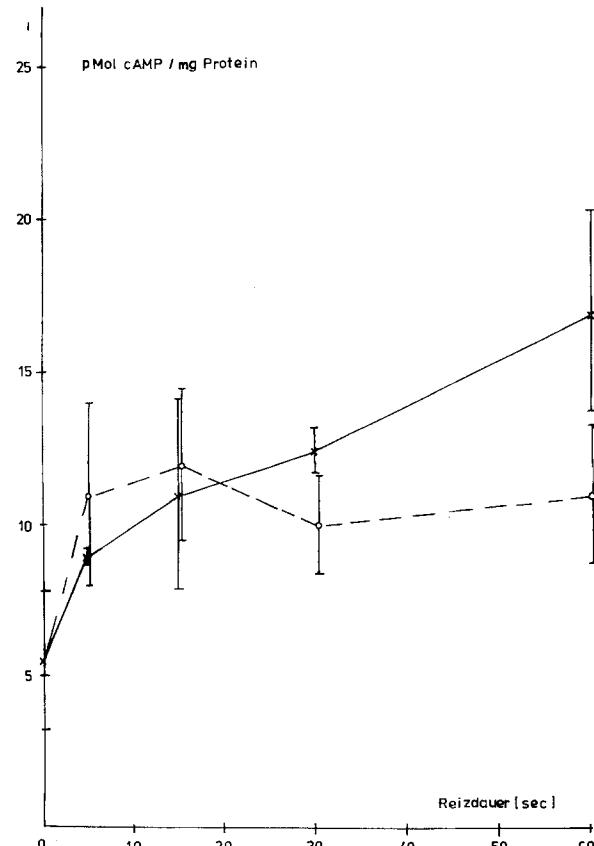


Fig. 2. cAMP-Gehalt in Thoraxhälften nach elektrischer Stimulation. Gestrichelte Linien: Reizfrequenz 2 Doppelimpulse/sec; durchgezogene Linie: Reizfrequenz 20 Doppelimpulse/sec. Die vertikalen Linien geben die Standardabweichungen an.

Phosphorylase-Aktivität wirkt, cAMP kann aber nicht der einzige regulierende Faktor sein, da bei der hohen Reizfrequenz die Phosphorylase-Aktivität sinkt, obwohl die cAMP-Konzentration erhöht ist. Da gleichzeitig eine Erschlaffung der Muskeln eintritt, also eine Abnahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Sarcoplasma stattgefunden hat, ist zu vermuten, dass der Rückgang der Phosphorylase-Aktivität ebenfalls durch die Abnahme der Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  verursacht wird. Das entspricht den erwähnten Untersuchungen von HANSFORD und SACKTOR<sup>6</sup>.

<sup>14</sup> Der benutzte Szintillationszähler wurde aus Mitteln des Landesamtes für Forschung, Düsseldorf angeschafft.

Welche Rolle das zyklische AMP in den Flugmuskeln von *L. migratoria* spielt, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

**Summary.** In half-thorax of *Locusta migratoria*, the activity of phosphorylases and the level of cAMP was studied during electrical stimulation of flight muscles. Both phosphorylase activity and cAMP level increased during phasic and tetanic contractions but no exact correlation could be found.

C. BOCKBREDER<sup>14</sup>

Zoologisches Institut der Universität  
Tierphysiologischer Lehrstuhl, Hindenburgplatz 55,  
D-44 Münster (BRD), 8 June 1974.

### Transplantation and 'Cross-Transplantation' of Free Muscle Grafts in the Rat<sup>1</sup>

The free grafting of entire mammalian skeletal muscles has seldom been employed in either experimental or clinical applications. Free grafts of muscle weighing more than 1 or 2 g are normally unsuccessful. The transplanted muscle necrotizes and is largely replaced by a band of dense connective tissue. In contrast, small muscles<sup>2</sup> or larger muscles that have been denervated beforehand<sup>3-5</sup> can be freely grafted with considerable success.

This investigation was designed to compare the reactions to free autografting of normal and previously denervated extensor digitorum longus (EDL) and soleus (SOL) muscles in young rats. The grafting technique was then used to study the effects of cross-transplanting a fast muscle into the bed of a slow one and vice versa. Earlier morphological work<sup>5,6</sup> has shown that the basis for the success of freely grafted muscles is the early degeneration of most of the mature muscle fibres within the graft and the subsequent regeneration of a new population of muscle fibres. Therefore the experiments on cross transplantation of fast and slow muscles demonstrate the influence of the nerve supply upon functional properties of regenerating muscle in contrast to previous cross-innervation studies in which the muscle remains anatomically and histologically stable, and

only its nerve supply is changed. The cross-transplanted muscles are not only innervated by a foreign nerve, but they are also located in the functional environment of the type of muscle in whose place they are substituted. These differences between cross-innervation and cross-transplantation models could be advantageous in analysis of long term nerve-muscle interactions<sup>7</sup>.

**Materials and methods.** The experiments were carried out upon 1-month-old male Wistar rats, (60 g). Transplantation was done by removing intact the EDL or SOL muscle from one leg and transplanting it in place of the

<sup>1</sup> Work performed during an exchange between the Czechoslovak and US Academies of Sciences and supported in part by a grant from the MDAA.

<sup>2</sup> R. P. ZHENEVSKAYA, O. N. RUMYANTSEVA, I. L. NOVOSELOVA and E. V. PROSHLYAKOVA, Zh. obshch. Biol. 26, 569 (1965).

<sup>3</sup> A. N. STUDITSKY and N. N. BOSOVA, Arkh. Anat. Gistol. Embriol. 39, 18 (1960).

<sup>4</sup> N. THOMPSON, Plastic Reconstr. Surg. 48, 11 (1971).

<sup>5</sup> R. P. ZHENEVSKAYA, *Neurotrophic Regulation of the Plastic Activity of Muscular Tissue* (Nauka, Moscow,) Russian.

<sup>6</sup> B. M. CARLSON and E. GUTMANN, unpublished observations.

<sup>7</sup> A. J. BULLER, J. C. ECCLES and R. M. ECCLES, J. Physiol., Lond. 150, 417 (1960).

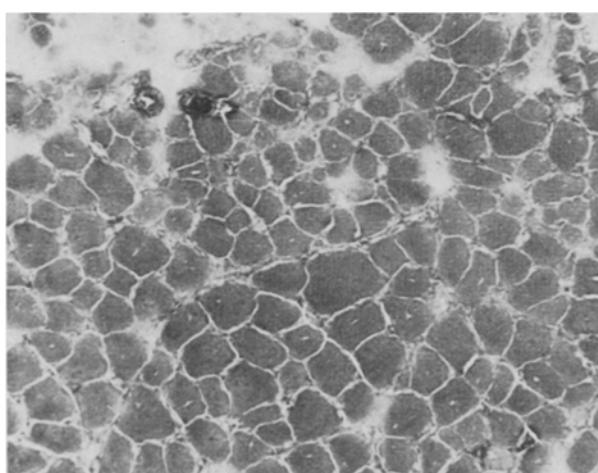


Fig. 1. 30-day extensor digitorum longus transplant stained for ATPase activity. The staining pattern of the muscle fibres is uniform throughout.

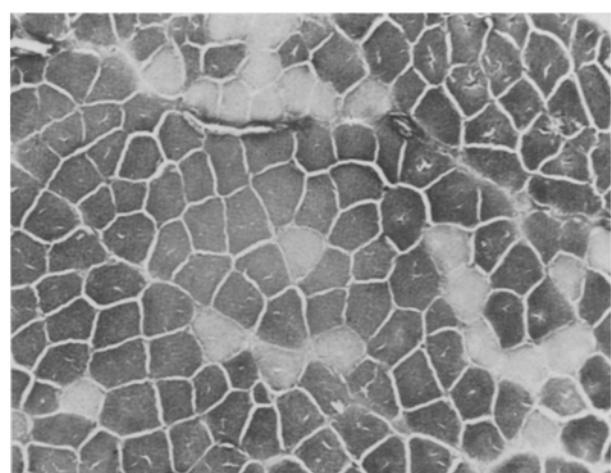


Fig. 2. 60-day extensor digitorum longus transplant stained for ATPase activity. Dark fibres with high amounts of ATPase activity may now be clearly distinguished from light fibres with less activity.